

IMMUNOSUPPRESSANT**Publication number:** JP11279204**Publication date:** 1999-10-12**Inventor:** FUJIMIYA YOSHIAKI**Applicant:** SUMITOMO FORESTRY**Classification:****International:** A23L1/212; A23L1/28; A61K31/715; A61P37/00;
C08B37/00; A23L1/212; A23L1/28; A61K31/715;
A61P37/00; C08B37/00; (IPC1-7): C08B37/00;
A23L1/212; A23L1/28; A61K31/715**European:****Application number:** JP19980081580 19980327**Priority number(*):** JP19980081580 19980327[Report a data error here](#)**Abstract of JP11279204**

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an Immunosuppressant capable of solving the problems of adverse reactions of conventional immuno-suppressants such as a cytotoxicity, a reduction in infection resistance, a suppression of the production of bone marrow hemopoietic cells, or the like, and providing a new usage such as a graft versus host reaction inhibitor, or the like, by using a polysaccharide component obtained from fruit bodies of Agaricus blazei. **SOLUTION:** This Immunosuppressant is a polysaccharide component obtained as a hot water soluble component from fruit bodies of Agaricus blazei and used for suppressing immune reactions. The polysaccharide component is preferably obtained by treating the fruit bodies of Agaricus blazei with a heated 80-85% ethanol for 18-22 hr, then repeating the same process at least 3 times, extracting the above extraction residue with hot water for 18-22 hr, repeating the hot water extraction for at least 3 times and lyophilizing for concentrating the obtained hot water soluble component. In an Immunosuppressive treatment, administrations by an oral or injection can be adopted. Usually, the polysaccharide component is administered in a dosage of 5-100 mg/kg body weight. In a functional food, it can be added by 0.001-0.1 wt%.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-279204

(43)公開日 平成11年(1999)10月12日

(51)Int.Cl. ^a	識別記号	F I
C 08 B 37/00		C 08 B 37/00
A 23 L 1/212	101	A 23 L 1/212
1/28		1/28
A 61 K 31/715	ABC	A 61 K 31/715

審査請求 未請求 請求項の数 6 OL (全 5 頁)

(21)出願番号	特願平10-81580	(71)出版人	000183423 住友林業株式会社 大阪府大阪市中央区北浜4丁目7番28号
(22)出願日	平成10年(1998)3月27日	(72)発明者	藤吉 方幸 大阪府大阪市中央区北浜4丁目7番28号 住友林業株式会社内
		(74)代理人	弁理士 桑村 哲 (外3名)

(54)【発明の名称】 免疫抑制剤

(57)【要約】

【課題】 カワリハラタケの子実体から得られる多糖類成分の免疫抑制剤としての新たな用途を提供することを目的とする。

【解決手段】 カワリハラタケの子実体から得られる熱水可溶性成分である多糖類成分は、細胞毒性和低く優れた免疫抑制作用を有し、従って、アレルギー反応抑制、臓器移植の際の拒絶反応抑制等に用いることができる。

(2)

特開平11-279204

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 カワリハラタケの子実体から熱水可溶成分として得られる多糖類成分であって免疫抑制に用いるための多糖類成分。

【請求項2】 多糖類成分は、カワリハラタケの子実体を加熱した7.5～9.0%エタノールで6時間～24時間処理し、得られた抽出残渣を集め、これを熱水で6時間～24時間、望ましくは18時間～22時間抽出して可溶成分を集め、それを凍結乾燥して濃縮して得られる請求項1記載の多糖類成分。

【請求項3】 上記エタノールの抽出処理を少なくとも3回繰り返して得られる請求項2記載の多糖類成分。

【請求項4】 上記熱水による抽出処理を少なくとも3回繰り返して得られる請求項2または3記載の多糖類成分。

【請求項5】 請求項1から4のいずれかに記載の多糖類成分を有効成分として含有する免疫抑制剤。

【請求項6】 請求項1から4のいずれかに記載の多糖類成分を含有する免疫抑制作用を示す機能性食品。

【発明の詳細な説明】

・【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、カワリハラタケの子実体から得られる免疫抑制に用いるための多糖類成分、それを含有する免疫抑制剤、並びにそれを含有する免疫抑制剤作用を示す機能性食品に関する。更に詳細には、臓器移植の際の拒絶反応抑制及び移植片対宿主反応抑制、さらにアレルギー反応抑制、自己免疫疾患改善等に用いるためのカワリハラタケの子実体から得られる多糖類成分に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、免疫抑制剤としてシクロホスファミド等、臓器移植の際の拒絶反応抑制剤としてサイクロスボリン等、アレルギー治療薬として抗ヒスタミン剤等、自己免疫疾患改善剤としてステロイド等が知られているがいずれも副作用が解決できず、移植片対宿主反応抑制剤としては感染症造血障害などがある場合、その使用に制限があった。

【0003】他方、キノコの1種であるハラタケ属に属するカワリハラタケ (*Agaricus blazei* Murrill) は、薬理活性を発揮する成分を多く含有していることが知られており、近年広く栽培されるようになり、糖尿病や高血圧の治療に利用されている。また、カワリハラタケの子実体から熱水抽出によって得られる可溶成分である多糖類成分は抗腫瘍活性を有することが報告されており(特開平2-211848号公報、Agric. Biol. Chem., 54 (11), 2889-2896, 1990など)、抗腫瘍剤としての利用が期待されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、カワリハラタケの子実体から得られる多糖類成分の新たな用

2

途を提供することにある。更に詳細には、細胞毒性、感染抵抗力低下及び骨髓の造血細胞の産生抑制等の従来の免疫抑制剤の副作用の課題を解決できることが期待され、移植片対宿主反応抑制剤等として用いることができるカワリハラタケの多糖類成分の新たな用途を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、カワリハラタケの子実体から得られる多糖類成分の薬理作用について銳意研究した結果、該多糖類成分が免疫抑制作用を有することを新たに見出し本発明を完成した。即ち、本発明は、カワリハラタケの子実体から熱水可溶成分として得られる多糖類成分であって免疫抑制に用いるための多糖類成分に関する。更に本発明は、上記多糖類成分を有効成分として含有する免疫抑制剤に関する。更に本発明は、上記多糖類成分を含有する免疫抑制作用を示す機能性食品に関する。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明で対象とする多糖類成分は、Agric. Biol. Chem., 54 (11), 2889-2896, 1990; 特開平2-211848号公報等に記載されており、公知の方法によってカワリハラタケの子実体から得ることができる。例えば、カワリハラタケの子実体を、加熱した7.5～9.0%エタノールで6時間～24時間処理し、得られた抽出残渣を集め、これを熱水で6時間～24時間、望ましくは18時間～22時間抽出して可溶成分を集め、それを凍結乾燥して濃縮して得ることができる。好ましくは、カワリハラタケの子実体を加熱した7.5～9.0%、望ましくは8.0～8.5%エタノールで6時間～24時間、望ましくは18時間～22時間処理し、この過程を少なくとも3回繰り返し得られた抽出残渣を集め、これを熱水で6時間～24時間、望ましくは18時間～22時間抽出して可溶成分を集め、この過程を少なくとも3回繰り返し、それを凍結乾燥して濃縮して強力な免疫抑制作用を有する多糖類成分を得ることができる。

【0007】また、上記の如くして得られる熱水可溶成分を更にエタノール沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル通過、アフィニティクロマトグラフィー等に付して精製することもできる。このようにして得られる多糖類成分には、(1, 6); (1, 4)- α -D-グルカン、(1, 6); (1, 3)- β -D-グルカン等の多糖類成分、あるいはそれらに蛋白が結合した多糖類成分が含有されていると考えられる。

【0008】カワリハラタケの子実体から得られる多糖類成分は、本発明者の研究により、優れた免疫抑制作用を有することが明らかとなった。後述する実施例に示すように、多糖類成分は、腫瘍細胞に対する脾臍細胞の傷害活性を抑制し、他方、腫瘍細胞及び脾臍細胞に対して直接毒性を発揮しないことが明らかとなった。また、多

(3)

特開平11-279204

3

糖類成分は、脾臓細胞の特にT細胞に関係し、脾臓細胞の腫瘍細胞認識を阻害するものと考えられる。従って、多糖類成分は、副作用の低減された免疫抑制剤として有用であることが明らかとなり、例えば、臓器移植の際の拒絶反応抑制剤、移植片対宿主反応抑制剤、アレルギー反応抑制剤、自己免疫疾患改善剤等に用いることができる。また、免疫抑制作用を発揮する機能性食品として利用することもできる。

【0009】本発明の多糖類成分は、免疫抑制治療に適用する場合には、経口投与あるいは注射による投与が採用される。経口投与の場合の剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤などが挙げられ、これらは通常の方法により調製することができる。注射剤も通常用いられる注射用ピーカルに多糖類成分を溶解もしくは分散させる通常の方法によって調製することができる。本発明の多糖類成分の投与量は、投与ルートなどによって変動するが、通常5～100mg/体重kgである。

【0010】また、本発明の多糖類成分は、機能性食品の有効成分として用いることもできる。機能性食品として用いる場合には凍結乾燥品とした後、既存の食品に一定の割合にて配合し、食品とする。例えば、その凍結乾燥品を含んだりかけとして、あるいはティーパックやカプセルに調製して用いることができる。また、その凍結乾燥品あるいは濃縮液、乳製品、油脂製品、調味料、菓子、果実ジュース、清涼飲料等に添加して用いるともできる。これらに用いる場合の多糖類成分の添加量は、通常、食品中に0.001～0.1重量%含有する量である。

【0011】

【実施例】以下、本発明を実施例により更に詳細に説明する。

実施例1

1.多糖類成分の抽出

含水率5%以下に乾燥したアグリクスの子実体30kgを、5mm以下の断片になるよう粗粉碎した。それに80%（v/v）エタノール270リットルを加え、70～80°Cで加熱還流下22時間抽出した。固液分離した後、残渣に80%（v/v）エタノール270リットルを上記と同様に処理し、これを3回繰り返した。上記抽出残渣に精製水270リットルを加え、80～90°Cで加熱還流下22時間抽出し、固液分離後、残渣に精製水270リットルを加え再び上記のように抽出し、これを3回繰り返した。精製水に可溶性の分画を多糖類成分として以下の実験試験に用いた。この多糖類成分のNMRの初步的解析により、この成分は文献(Agric. Biol. Chem., 54 (11), 2889-2896, 1990)の記載から、数%の蛋白が結合している(1, 6); (1, 4)- α -D-グルカンと(1, 6); (1, 3)- β -D-グルカンが2:1の割合で混合している分子量50万～200万の物質である。

(4)

特開平11-279204

4

【0012】2.免疫機能抑制試験

i) 方法

Sarcoma 180腫瘍細胞を 4×10^6 /マウスの割合で動物(C3H/NJマウス)の腹腔内に投与し、72時間後脾臓細胞を採取しこれをエフェクター細胞とした。一方、腹腔内で継代した新鮮Sarcoma 180腫瘍細胞をCr-51でラベルし、ターゲット細胞とした。96穴のマイクロタイマーにあらかじめ適宜希釈したエフェクター細胞を培養しておき、一定数のラベルした腫瘍細胞(10^6)を添加し、5%CO₂下で24時間、37°Cで培養した。その後上清を採取しその中のCr-51遊離量をガンマカウンターで測定し、腫瘍細胞に対するエフェクター細胞の傷害活性を検査した。上記と同じ条件で、免疫機能抑制実験系として腫瘍細胞と多糖類成分(0.5mg/マウス)を同時に腹腔内に投与した。やはり72時間後脾臓細胞を採取し、エフェクター細胞として上記と同じ条件で腫瘍細胞に対する傷害活性を24時間Cr-51法で検査した。

【0013】ii) 結果

図1に腫瘍細胞に対するエフェクター細胞の傷害活性の結果を示した。腫瘍細胞だけを腹腔内に投与した後、脾臓細胞を採取し、試験管内で脾臓細胞の腫瘍細胞に対する傷害活性を調べたところ、図1に示されるように非常に効率良く腫瘍細胞を傷害した。次に腫瘍細胞と多糖類成分を同時に腹腔内に投与し、同じように活性を調べたところ、図1に示されるように殆ど腫瘍細胞に対する傷害活性が認められなかった。またコントロールとして、腫瘍細胞も多糖類成分も投与しないマウスの脾臓細胞は試験管内試験で全く腫瘍細胞に対して傷害活性を示さなかった。又多糖類成分だけを投与した場合でも全く傷害活性が認められなかった(図1ではデータなし)。以上の通り、カワリハラタケの子実体から得られる多糖類成分は、腫瘍細胞に対する脾臓細胞の傷害活性を強力に抑制し、免疫抑制作用を有することが明らかとなった。

【0014】3.多糖類成分の脾臓細胞及び腫瘍細胞に対する直接傷害活性試験

i) 方法

多糖類成分が、脾臓細胞及び腫瘍細胞に及ぼす直接傷害活性を以下の方法で調べた。正常マウスより脾臓細胞を採取し、24穴のウェルに 1×10^6 /mlになるよう接種した。また、腫瘍細胞は 1×10^5 /mlの濃度でウェルに接種した。それぞれのウェルに対して0～500μg/mlの濃度の多糖類成分を添加して24時間後の脾臓細胞及び腫瘍細胞の生存性をトリパンブルーエクスクリューションテストで検討した。なお72時間後では脾臓細胞が自然に死滅し、両者を比較できなかった。

【0015】ii) 結果

得られた結果を図2に示した。図2の成績で明らかのように、500～5μg/mlの濃度の範囲では、多糖類成分は脾臓細胞も腫瘍細胞も傷害しなかった。従って、

(4)

特開平11-278204

6

多糖類成分は、脾臓細胞及び腫瘍細胞に対して直接毒性効果を発揮するものではないことが明らかとなった。

[0016] 4. 腫瘍細胞に対して傷害活性を有する細胞集団の同定

i) 方法

上記1～3の試験における腫瘍細胞に対して傷害活性を発揮する細胞、即ちキラー細胞を以下的方法によって同定した。上記の試験2のi) の方法と同様にして、動物を腫瘍細胞で感作した後、動物から採取した脾臓細胞（エフェクター細胞）を、モノクローナル抗体（mAb）抗B細胞モノクローナル抗体（anti-B220 mAb）か抗T細胞モノクローナル抗体（anti-Thy1.2 mAb）（それぞれSerotec社）で1時間氷上で反応させて処理し、反応後37°Cで免疫複合体（Cederlane社）の存在下で更に1時間反応させた。反応後の腫瘍細胞に対する脾臓細胞の傷害活性を、上記の試験2のi) の方法と同様にして調べた。

[0017] ii) 結果

得られた結果を図3に示した。図3の結果で明確に示されたように、抗T細胞モノクローナル抗体（anti-Thy1.2 mAb）処理により、脾臓細胞（エフェクター細胞）の腫瘍細胞（ターゲット細胞）に対する傷害活性が劇的に失われた。従って、傷害活性を獲得した細胞集団は細胞傷害性Tリンパ球（cytotoxic T lymphocytes: CTL）であることが明らかとなった。以上の試験から明らかな如く、図1の結果から多糖類成分を腫瘍細胞と一緒に腹腔内に投与すると、脾臓細胞の腫瘍細胞に対する傷害活性が全く認められなかった。またこの多糖類成分は図2の成績から腫瘍細胞にも脾臓細胞にも直接傷害作用がなかったことから、この多糖類成分が脾臓細胞の腫瘍細胞認識を阻害する可能性が考えられる。

[0018] 実施例2

免疫抑制剤の製造

(a) アグリクス子実体をブレンダーで粉碎し、加熱還流下で80%エタノールで24時間抽出する操作を3回繰り返し、その残渣を更に3回に分けて熱水抽出しこの熱水に溶出したものを凍結乾燥し、それを1ミリグラム、シュークロースを10ミリグラム、クエン酸ナトリウムを1.5グラムを1ミリリットルの精製水に溶かし注射液として用いる。

(b) アグリクス子実体をブレンダーで粉碎し、加熱還流下で80%エタノールで24時間抽出する操作を3回繰り返し、その残渣を更に3回に分けて熱水抽出しこの熱水に溶出したものを凍結乾燥し、それを1ミリグラムを1ミリリットルの生理食塩水に溶かし注射液として用いる。

[0019] 実施例3

抗アレルギー食品の製造

アグリクス子実体をブレンダーで粉碎し、加熱還流下で80%エタノールで24時間抽出する操作を3回繰り返し、その残渣を更に3回に分けて熱水抽出しこの熱水に溶出したものを凍結乾燥し、一定量をティーバッグに詰め、お茶として用いる。

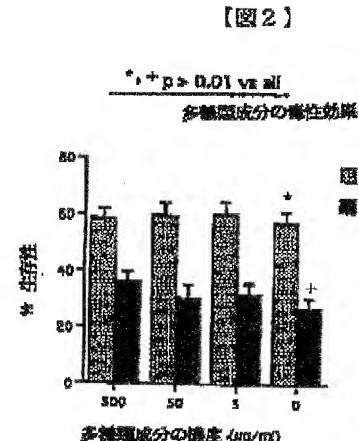
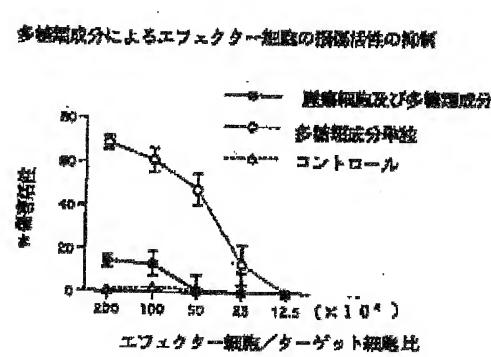
[0020]

【発明の効果】カワリハラタケの子実体から得られる熱水可溶成分である多糖類成分は、毒性の低い免疫抑制剤として極めて有用である。また酸多糖類成分は、免疫抑制剤として用いた場合比較的長期に渡り活性を持続することが期待される。また抗原刺激により遊離されるヒスタミンやセロトニンなどの炎症性物質の発現を抑制し、抗アレルギー食品として利用の可能性もある。

【図面の簡単な説明】

【図1】 多糖類成分による、エフェクター細胞の傷害活性の抑制

【図2】 多糖類成分の、腫瘍細胞及び脾臓細胞に対する毒性効果



(5)

特開平'11-279204

【図3】

キラー細胞の固定

